



1619
#2
MPL
11/03/01

PATENT
0425-0854P

OCT 29 2001

RECEIVED

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: KONDO et al. Conf.: 9474

Appl. No.: 09/963,365 Group: UNASSIGNED

Filed: September 27, 2001 Examiner: UNASSIGNED

For: ANTIOXIDANT CONTAINING VITAMIN E
METABOLITE

L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

October 25, 2001

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicant(s) hereby claim(s) the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	2000-294802	September 27, 2000

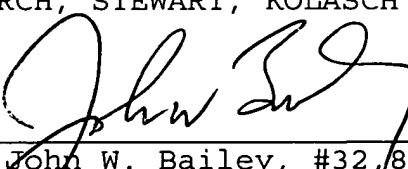
A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By


John W. Bailey, #32,881

P.O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747
(703) 205-8000

JWB/end
0425-0854P

Attachment



日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

Kondo et al.
Appl. No. 09/963, 365
Filed Sept. 27, 2001
Docket No. 0425-0854f
Birch, Stewart, Kolasch
& Birch, LLP
(703) 205-8000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年 9月27日

OCT 29 2001

RECEIVED
TECH CENTER 1600/2900

出願番号
Application Number:

特願2000-294802

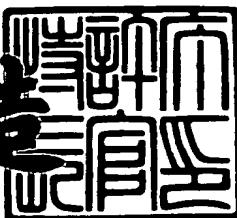
出願人
Applicant(s):

エーザイ株式会社

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2001年 9月 7日

及川耕造



出証番号 出証特2001-3082890

【書類名】 特許願

【整理番号】 EP00SY0902

【提出日】 平成12年 9月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 31/35

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区湯島4-9-16

【氏名】 近藤 和雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都墨田区東向島4-39-2

【氏名】 五十嵐 僕

【発明者】

【住所又は居所】埼玉県浦和市文蔵4-28-5

【氏名】 清瀬 千佳子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代5-9-34

【氏名】 吉村 寛幸

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県奈良市西大寺赤松町1-8-8-1

【氏名】 吉武 繁廣

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代表者】 内藤 晴夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004983

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビタミンE代謝物含有抗酸化剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物である抗酸化剤。

【請求項2】 2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物を含有する抗酸化剤

【請求項3】 代謝酵素により2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンに変換することによって抗酸化作用を示す α -トコフェロール及び／又は α -トコトリエノールを含有する抗酸化剤。

【請求項4】 代謝酵素により2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンに変換することによって抗酸化作用を示す γ -トコフェロール及び／又は γ -トコトリエノールを含有する抗酸化剤。

【請求項5】 2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物を含有する動脈硬化予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗酸化作用を示すビタミンE代謝物に関する発明であり、食品医薬分野における発明である。

【0002】

【従来の技術】

トコフェロールおよびトコトリエノールは抗酸化作用を有することが知られている。

一方、カルボキシエチルヒドロキシクロマン類はトコフェロールならびにトコトリエノールの生体内代謝物であり、その中の2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンはナトリウム利尿作用を有することが知られている (Wechter et al., Proc Natl Acad Sci USA, 93, 6002-6007, 1996) がそれ以外の作用については知られていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

α -トコフェロールがその抗酸化作用によって、LDL（低密度リポ蛋白）の酸化を抑制し、それが動脈硬化の発症を抑制する可能性が示唆されている。一方で、他の同族体、例えば γ -トコフェロール、トコトリエノール等は経口投与しても血中には未変化体としてほとんど検出されず、それらが生体内において抗酸化作用を有するか否かはいまだ明らかではない。そこで、本発明者はトコフェロールならびにトコトリエノールの生体内代謝物であるカルボキシエチルヒドロキシクロマン類の作用を鋭意検討した結果、意外にも以下に示す化合物に抗酸化作用を示すことを見出し本発明を完成した。

【0004】

【課題を解決するための手段】

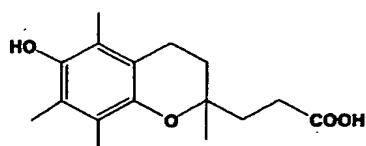
本発明は2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物である抗酸化剤である。また、本発明は、2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物を含有する抗酸化剤である。更に、本発明は、生体内で2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンに変換することにより抗酸化作用を示す α -トコフェロール及び／又は α -トコトリエノールを含有する抗酸化剤、又は生体内で2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンに変換することにより抗酸化作用を示す γ -トコフェロール及び／又は γ -トコトリエノールを含有する抗酸化剤である。更に本発明は、2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエ

チル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物を含有する動脈硬化予防・治療剤である。

【0005】

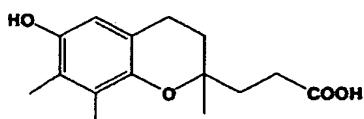
本発明における2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンは α -トコフェロール又は α -トコトリエノールの代謝物であり、以下の構造式を有する化合物である（以下、 α -CEHCと称する）。

【化1】



また2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンは、 γ -トコフェロール又は γ -トコトリエノールの代謝物であり、以下の構造式を有する化合物である（以下、 γ -CEHCと称する）。

【化2】



α -CEHC及び γ -CEHCが代謝酵素により生成した場合は、光学活性体（S体）が生成するが、本発明にかかる抗酸化剤又は動脈硬化予防・治療剤はラセミ体を用いてもよい。

α -CEHC及び γ -CEHCは、公知の方法により製造することもできる。また、これらの物質は無機物又は有機物と塩を作ってもよく、更にこれらの物質又はその塩は水和物であってもよい。

【0006】

抗酸化剤としての α -CEHC及び／又は γ -CEHCの有効量は、一概に言えないが、例えば、血液中では約200pmol/mLである。 α -CEHC及び／又は γ -CEHCは、生体内に限らず、医薬品、食品、飼料等に配合することによっても抗酸化作用を有し、 α -CEHC若しくは γ -CEHC単独、又は、 α -CEHC及び γ -CEHCを組合させて用いてもよい。

【0007】

また、 α -CEHC又は γ -CEHCは、それぞれ α -トコフェロール、 α -トコトリエノール又は γ -トコフェロール、 γ -トコトリエノールが生体内で変換することにより生成するため、 α -トコフェロール、 α -トコトリエノール、 γ -トコフェロール又は γ -トコトリエノールを投与することによっても、生体において抗酸化剤として作用する。従来、 α -トコフェロールは生体において抗酸化作用を有することが認められていたが、 α -トコトリエノール、 γ -トコフェロール及び γ -トコトリエノールの生体における作用は確認されていなかった。経口投与で体内において抗酸化作用を示すために必要な α -トコトリエノール、 γ -トコフェロール及び γ -トコトリエノールの一回の服用量は10～2000mgである。

【0008】

α -CEHC及び／又は γ -CEHCは抗酸化剤としてそのまま使用してもよいし、製剤化して用いてもよい。製剤化の例としては、 α -CEHC及び／又は γ -CEHCを、乳糖、マンニトール、無水ケイ酸類等の賦形剤と混合し、更にデンプン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の結合剤を混合し、水、エタノール等の溶媒を加えて造粒し、必要に応じて整粒後、乾燥して顆粒剤又は細粒剤を製造することができる。更に、こうした顆粒剤等を充填して、カプセル剤とすることや、打錠して錠剤とすることもできる。また、水に分散溶解して液体剤とすることもでき、必要に応じてエタノール等の有機溶媒、植物油、合成油、界面活性剤、矫味矫臭剤等を使用することもできる。

【0009】



【効果】

本発明にかかる化合物は抗酸化作用を示す。また、生体内において動脈硬化予防・治療剤として効果を表すものと考えられる。以下に、本発明にかかる化合物の効果を実験例によって示す。

【0010】

<方法>

1) LDLの調整

ヒトより採血した血液を3000rpmで10分間遠心にかけ、血漿を分離した。血漿1.1mLにKBrを添加した後、密度勾配超遠心分離法 (Single spin分画法) にて分取し、蛋白定量後、LDLをPBSにて調整した。

2) アゾ化合物 (V-70) による酸化変性LDL測定法

In vitroにおける酸化変性LDLの測定法は近藤らの方法を用いた。この方法は酸化開始剤として2,2-azobis (4-methyl-2,4-dimethylvaleronitrile ; V-70) を用いている。LDL蛋白濃度、約70 μg/mLに対してV-70の終濃度を200 μMとし、その時のLDLの共役ジエン生成を吸光度234nmで300分間測定した。共役ジエン生成を抑えている時間をラグタイムとして示した。各抗酸化物の効能はV-70を添加する際に同時に添加し、各抗酸化物によるラグタイムを測定し、評価を行った。

【0011】

<結果>

1) α-ならびにγ-CEHCによるLDLに対する抗酸化性

まず、最初にα-ならびにγ-CEHCを濃度依存的（終濃度：60～1000ng）にLDLに添加し、その抗酸化性について検討した。その結果、α-ならびにγ-CEHCとも濃度依存的にラグタイムを延長させた。このことにより、α-ならびにγ-CEHCともLDLに対して抗酸化性を示すことが明らかとなった。

【0012】

2) CEHCsならびにtroloxにおけるLDLに対する抗酸化性の比較（高濃度の場合）

次に、水溶性の合成抗酸化剤であるtroloxと比較した。成人男女8名から採血を行い、上記の方法に従ってLDLを分取した。このLDLにα-、γ-CEHCならびにtr

oloxをそれぞれ $1\mu\text{g}$ （終濃度）、LDLに添加し、ラグタイムを測定した。その結果、抗酸化剤無添加のコントロールの場合、ラグタイムが 88.1 ± 29.4 分だったのに対して、 α -CEHC添加群で 190.8 ± 65.1 分の有意な延長（ $p<0.01$ ）が認められ、さらに γ -CEHC添加群では 263.1 ± 114.8 分となり、 α -CEHCよりも γ -CEHCの方がLDLに対して有意に強い抗酸化性を示した。

【0013】

3) CEHCsならびにtroloxにおけるLDLに対する抗酸化性の比較（低濃度の場合）

Stahlら（Anal. Biochem. 1999, 275, 254-9）は、ヒトにRRR- α -トコフェロールを500IU投与した時の血漿中 α -CEHC濃度はおよそ 200pmol/mL であり、また、それと同時に食事から摂取した γ -トコフェロール由来の γ -CEHCはほとんどが遊離体で存在していると報告している。それゆえ、次に血漿中で存在しうる濃度でのLDLに対する抗酸化性についても検討した。上記の方法と同様にtrolox群も加え、添加終濃度を先ほど述べた 200pmol/mL に近い値（終濃度：60ng）に設定し、各群を比較した。

【0014】

結果を図1に示した。図ではコントロール群を1とし、ラグタイム延長率で示している。この結果、 γ -CEHC群では α -CEHC群、trolox群よりも有意にラグタイム延長率が高かった。これらの結果より、CEHC、特に γ -CEHCは血漿中において非常に有用な抗酸化剤となり、LDL膜表面にてトコフェロールと同様に抗酸化能を発揮することが示唆された。また、ビタミンE、特に γ -トコフェロール代謝物にこのような生理活性があることが示されたことから、今後、動脈硬化症ならびに心疾患治療のためのビタミンE効能が γ -トコフェロールを同時に投与することによってより強い働きを示す可能性が推測された。

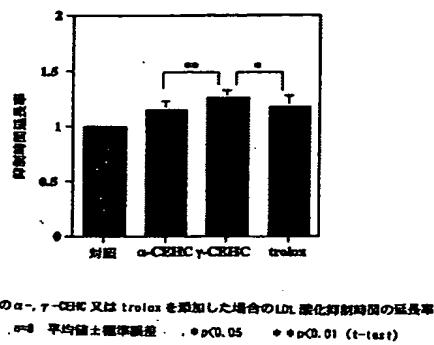
【0015】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はCEHC等を添加した場合のLDL酸化抑制時間の延長を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】



60ng の α -, γ -CERHC 又は trolox を添加した場合の LDL 漂化抑制時間の延長率
n=6 平均値±標準誤差 .. p<0.05 ** p<0.01 (t-test)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗酸化作用を示す化合物を提供する。

【解決手段】 2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩及び／又は2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマン若しくはその塩、又はこれらの水和物である抗酸化剤又は当該物質を含有する抗酸化剤。更に当該物質を含有する動脈硬化予防・治療剤。また、代謝酵素により2,5,7,8-テトラメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンに変換することにより抗酸化作用を示す α -トコフェロール及び／又は α -トコトリエノールを含有する抗酸化剤、又は代謝酵素により生体内で2,7,8-トリメチル-2(2-カルボキシエチル)-6-ヒドロキシクロマンに変換することにより抗酸化作用を示す γ -トコトリエノール及び／又は γ -トコトリエノールを含有する抗酸化剤。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000000217]

1. 変更年月日 1990年 8月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区小石川4丁目6番10号

氏 名 エーザイ株式会社